

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 2906650 C2

⑤ Int. Cl. 4:
A01N 1/00

⑰ Aktenzeichen: P 29 06 650.0-41
⑱ Anmeldetag: 21. 2. 79
⑲ Offenlegungstag: 28. 8. 80
⑳ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 24. 5. 89

DE 2906650 C2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦ Patentinhaber:
Pfrimmer-Viggo GmbH & Co KG, 8520 Erlangen, DE
⑭ Vertreter:
Czowalla, E., Dipl.-Ing. Dipl.-Landw.; Matschur, P.,
Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte, 8500 Nürnberg

⑦ Erfinder:
Baumgartner, Ludwig, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 8500
Nürnberg, DE

⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-PS	2 81 806
DE-AS	10 16 486
DE-OS	23 59 949
DE-OS	21 46 083
US	37 42 955
US	36 79 450

⑤ Verfahren zum Konservieren von Transplantat

DE 2906650 C2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Transplantatkonserven durch Dehydrieren von biologischem, kollagenem Material.

Zum Ersatz von biologischem Gewebe, z. B. Haut, Sehnen, Gefäßen, Nerven, Dura mater etc. wird bereits autologes, d. h. vom gleichen Patienten stammendes Gewebe verwendet. Zur Entnahme ist jedoch beim ohnehin schon geschwächten Patienten eine 2. Operation erforderlich, die außerdem aseptisches Arbeiten und einen hohen Zeitaufwand erfordert. Die Alternative zu einer Zweitoperation stellt eine gebrauchsfertige homologe oder heterologe Transplantatkonserven dar, die dem Chirurgen bei Bedarf jederzeit zur Verfügung steht.

Ein bekanntes Herstellungsverfahren für biologische Transplantate bedient sich der Gefriertrocknung. Hierbei wird das wasserhaltige kollagene Material bei ca. -25°C eingefroren und das enthaltene Wasser in der Zustandsform Eis durch Sublimieren im Vakuum entfernt. Daraus resultiert ein kollagenes Gewebematerial, welches nur einen geringen Wassergehalt aufweist und in sterilem Zustand praktisch beliebig lange unter Erhalt seiner Eigenschaften aufbewahrt und bei Bedarf gebrauchsfertig verwendet werden kann. Die Methode der Gefriertrocknung hat bei der Konservierung besonders eines flächigen kollagenen Gewebematerials jedoch mehrere Nachteile.

Kollagen ist ein Strukturprotein, sein Fasergeflecht quillt in feuchtem Zustand, wobei seine Dicke zunimmt. Durch das Tiefrieren wird der gequollene Zustand des kollagenen Gewebes sozusagen fixiert. Im Falle eines flächigen kollagenen Materials, z. B. der Dura mater, resultiert also ein relativ dickes, schwammartiges Material, dessen Handhabung als Transplantat dadurch eingeschränkt ist. Seine Dicke beträgt z. B. 0,66 mm.

Die beim Einfrieren zwischen den Fasern und Fibrillen entstehenden Eiskristalle lockern das kollagene Fasergefüge auf. Im histologischen Bild ist deshalb ein deutlicher Unterschied zwischen einem gefriergetrockneten kollagenen Gewebe und dem entsprechenden Gewebe im ursprünglichen, nativen Zustand ersichtlich. Infolge der Eiskristallbildung und der nachfolgenden Sublimation entstehen somit Hohlräume im Gewebe, wodurch sich seine Eigenschaften, wie z. B. Elastizität, verglichen mit dem Nativgewebe, stark verschlechtern. Die Elastizitätsgrenze, als Maß für die Elastizität, beträgt bei der Nativdura z. B. 1,8 kp, bei der gefriergetrockneten Dura z. B. 0,88 kp.

Ein weiteres Kriterium für die Qualität eines Transplantates — speziell für Ersatzplastiken — ist der Begriff der inneren Oberfläche. Die innere Oberfläche ist ein Maß für den Grad der Freilegung der Fibrillen und Fasern. Je weitgehender die Freilegung, d. h. je geringer die partielle Verleimung des Fasergefüges ist, desto größer ist die innere Oberfläche. Sie beträgt bei idealer Freilegung des Geflechtes ca. $20\text{ m}^2/\text{g}$. Der Wert der inneren Oberfläche ist deshalb ein wichtiges Kriterium, da das transplantierte Gewebenetz umso besser als Leitschiene für einspritzendes Bindegewebe fungieren kann, je mehr freie Fibrillen und Fasern in paralleler Regelmäßigkeit vorliegen.

Infolge einer partiellen Verleimung von Fasern und Fibrillen beträgt die innere Oberfläche gefriergetrockneter Durakonserven nur ungefähr $5 - 10\text{ m}^2/\text{g}$ (gemessen mit Stickstoffadsorptionsmethode).

Ein anderes Verfahren bedient sich der chemischen Konservierung. Dieses Verfahren ist nachteilig, da das

Gewebematerial mit chemischen Mitteln behaftet ist, die in das Operationsgebiet eingeschleppt werden.

Aufgrund der aufgezeigten Nachteile der bisherigen Verfahren ist es die Aufgabe der Erfindung, ein schonenderes Verfahren aufzuzeigen, welches die bei der Konservierung erforderlichen Eigenschaften eines kollagenen Transplantates nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die gewünschten Eigenschaften eines kollagenen Gewebes, z. B. der Dura mater, weitgehend erhalten bleiben, wenn die Dehydrierung mittels organischer, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel erfolgt. Das Verfahren ist besonders wirtschaftlich, da im Vergleich zum Gefriertrocknungsverfahren nur ein wesentlich geringerer apparativer Aufwand erforderlich ist.

Durch die Lösungsmitteldehydrierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt nach Maßgabe des Wasserentzuges eine Entquellung des kollagenen Gewebes, wodurch z. B. bei einem flächigen kollagenen Gewebe, wie der Dura mater, relativ dünnes, kompaktes Transplantatmaterial entsteht. Seine Dicke beträgt z. B. 0,47 mm. Wegen der nichtgeschädigten Struktur des multidirektionalen Fasergeflechts ist das Gewebe durch keinerlei Vakuolen aufgelockert, was zur Folge hat, daß ein wegen seiner Eigenschaften gut verwertbares und wegen der geringeren Dicke und seiner Geschmeidigkeit für den Arzt gut zu handhabendes Material entsteht.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Transplantatkonserven ermöglicht eine Dehydrierung und Freilegung bis in den Feinbau der Fibrille des kollagenen Gewebes, so daß ein Verleimen von Fibrille und Faser unterbunden wird. Infolge der optimalen Freilegung von Faser und Fibrille weist das biologische Material, z. B. Dura mater, im histologischen Bild eine dem Nativgewebe sehr ähnliche morphologische Struktur auf.

Es ergeben sich somit Eigenschaften, die dem Nativgewebe weitgehend entsprechen. Die Elastizität bleibt praktisch erhalten, und die Dehnbarkeit ist gleichzeitig äußerst gering. Die Elastizitätsgrenze beträgt z. B. 1,45 kp.

Diese Eigenschaften determinieren die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Transplantatkonserven zu einem idealen Material für Ersatzplastiken, z. B. für die Deckung von Bauchwanddefekten.

Das Verfahren zur Herstellung von Transplantatkonserven mittels organischer, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln bringt somit gegenüber den bisher bekannten Methoden eine Reihe von Vorteilen, indem es zum Konservieren von biologischen kollagenen Materialien, wie Haut, Gefäßen, Nerven, Sehnen, Faszen, Knorpel, Dura mater etc. geeignet ist.

Mit besonderem Vorteil werden als Dehydrierungsmittel Methanol, Äthanol, Propanol, Isopropanol, Aceton, Methyl-Äthylketon oder Gemische dieser Lösungsmittel verwendet.

Bei einer möglichen Ausführungsform der Erfindung wird diese so verwirklicht, daß die Dehydrierung kontinuierlich im Gegenstromverfahren erfolgt. Hierdurch wird ständig neues Lösungsmittel herangeführt, das dementsprechend eine hohe Aufnahmebereitschaft für das zu entziehende Wasser aufweist.

Andererseits ist es auch mit Vorteil möglich, daß die Dehydrierung diskontinuierlich über mehrere Stufen erfolgt. Dabei verbleibt das Transplantatgewebe z. B. über einen bestimmten Zeitraum in einem ersten

Gefäß mit Lösungsmittel und wird danach in ein weiteres Gefäß mit dem gleichen oder einem anderen Lösungsmittel umgesetzt, wenn die Fähigkeit des ersten Lösungsmittels, Wasser zu entziehen, nachläßt. Je nach den Erfordernissen können noch weitere Stufen folgen, bis der angestrebte Endzustand erreicht ist.

Als günstig erweist es sich, daß die Dauer der Dehydratisierungsbehandlung 2 bis 24 Stunden, insbesondere 5 bis 12 Stunden, beträgt.

Mit Vorteil erfolgt die Trocknung des lösungsmittel-feuchten kollagenen Transplantats bei niedrigem Druck zwischen 0,1 bar und 0,95 bar, insbesondere bei 0,5 bar. Durch die Druckabsenkung gegenüber dem Atmosphärendruck wird die Verdunstung des Lösungsmittels und damit der Trocknungsvorgang beschleunigt.

Andererseits kann es, z. B. aus verfahrensökonomischen Gründen, auch vorteilhaft sein, daß die Trocknung des Transplantats bei Atmosphärendruck erfolgt.

Schließlich kann erfindungsgemäß die Trocknung des lösungsmittelfeuchten kollagenen Transplantats bei Temperaturen von 10–70°C, insbesondere bei 37°C vorgenommen werden. Die Temperatur von 37°C entspricht etwa der Körpertemperatur, so daß sichergestellt ist, daß das Gewebe keinen thermischen Schaden nimmt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Transplantatkonserven kann entsprechend den nachstehend aufgeführten Beispielen durchgeführt werden:

Beispiel 1

Dura mater wird dem menschlichen Körper entnommen und in geeigneter Weise von antigenen Stoffen und Enzymen befreit. Zur Konservierung werden die so gereinigten Gewebestücke durch dreimaliges Einlegen in Aceton je 12 Stunden lang behandelt. Die Lösungsmittelmenge beträgt dabei 500% des Naßgewichtes des Gewebes. Nach Entnahme der Durastücke aus dem letzten Lösungsmittelbad erfolgt eine Trocknung bei reduziertem Druck von 0,5 bar.

Die dehydratisierte Dura weist nach dem Trocknungsprozeß einen Wassergehalt von 5% auf. Ihre Dicke beträgt 0,45 mm, die innere Oberfläche 21 m²/g, die Elastizitätsgrenze 1,40 kp. Im histologischen Bild zeigt die Konserve eine der Nativdura weitgehend identische Struktur, die Fasern sind durch keine Vakuolen aufgelockert.

Nach dem Verpacken in feuchtigkeitsdichten Beuteln und Sterilisieren mit Gammastrahlen mit einer Mindestdosis von 2,5 Mrad, ist die Dura mater-Konserve praktisch unbeschränkt lagerfähig und für Transplantationen gebrauchsfertig.

Beispiel 2

Sehnenstücke werden wie nach Beispiel 1 gereinigt. Durch nacheinanderfolgendes Einlegen in sechs Bäder von Isopropanol wird das Gewebe dehydratisiert. Dabei verbleiben die Sehnenstücke je 10 Stunden lang in der Alkohollösung. Die Alkoholmenge in den Bädern beträgt 50% des Naßgewichtes des Gewebes. Nach Entnahme aus dem letzten Alkoholbad werden die Sehnenstücke 12 Stunden bei 0,5 bar vom restlichen Alkohol befreit. Der resultierende Wassergehalt beträgt 10%.

Beispiel 3

Die dem menschlichen Körper entnommene Faszialata wird in geeigneter Weise von antigenen Stoffen und Enzymen befreit. Zur Konservierung wird die Faszialata jeweils 5 Stunden lang in drei hintereinandergeschaltete Bäder mit Isopropanol dehydratisiert. Die Alkoholmenge beträgt dabei jeweils 500% des Naßgewichtes des Gewebes. Die so behandelte Faszialata wird dem letzten Bad entnommen und bei Atmosphärendruck – und Raumtemperatur ca. 20°C – getrocknet.

Der resultierende Wassergehalt beträgt 9%. Das Transplantat wird in feuchtigkeitsdichten Kunststoff- bzw. Aluminiumbeuteln verpackt und mit 2,5 Mrad bestrahlt.

In diesem Zustand ist die Faszialatakonserve praktisch unbegrenzt lagerfähig und für Transplantationen gebrauchsfertig.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Konservieren von Transplantat durch Dehydratisieren von kollagenen Material, dadurch gekennzeichnet, daß mit einem organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel dehydratisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel Methanol, Äthanol, Propanol, Isopropanol, Aceton, Methyl-Äthylketon oder Gemische dieser Lösungsmittel verwendet werden.

